

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin
(Direktor Prof. Dr. med. O. H. Gauer) und der
I. Med. Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
(Direktor Prof. Dr. med. H. Bartelheimer)

Mikrophotometrische Untersuchungen am
hyalinen Knorpel zum Mechanismus der Azanfärbung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

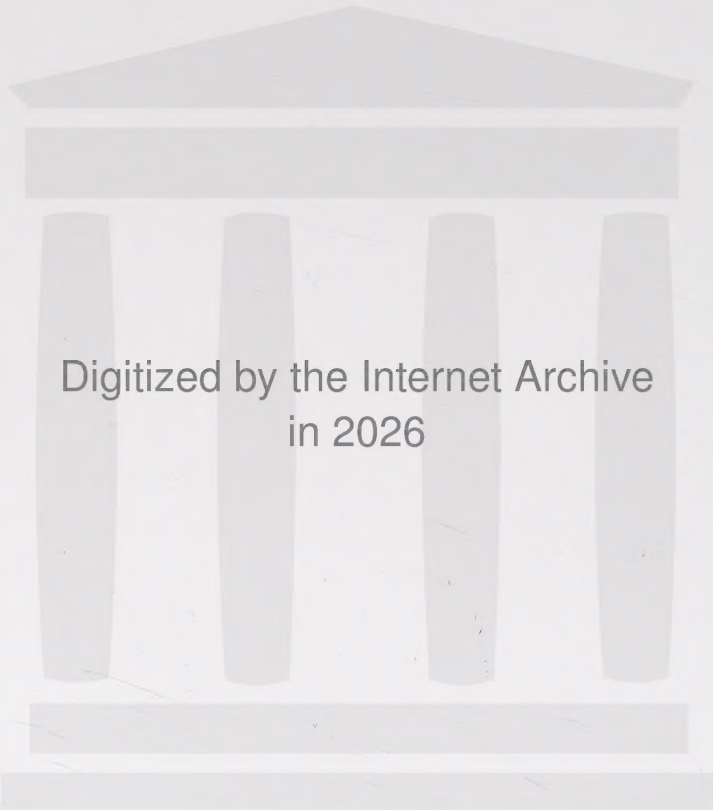
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Boeck

aus Berlin

1965



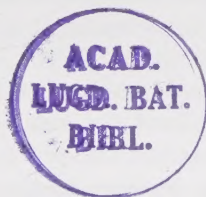
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550805_0057

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin (Direktor Prof. Dr.med. O.H. Gauer) und der I. Med. Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr.med. H. Bartelheimer)

Mikrophotometrische Untersuchungen am
hyalinen Knorpel zum Mechanismus der
Azanfärbung

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Michael Boeck

aus

Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Adalbert L o e s c h k e

Referent: Priv.Doiz.Dr.med. Franz-Josef H a b e r i c h

Korreferent: Professor Dr.med. Otto H. G a u e r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 9. Februar 1965

I Einleitung

Die vorliegende experimentelle Arbeit soll zu den grundlegenden Ergebnissen BARTELHEIMERS und seiner Schule über die generalisierten halipenischen Osteopathien und der damit in den Vordergrund gerückten Knochenbiopsie einen Beitrag leisten. BARTELHEIMER hat sich von den Unzulänglichkeiten des Routineröntgenbildes bei der Erkennung dieser Erkrankungen abgewandt, da erst bei einem relativ hohen Entkalkungsgrad ($1/3$ nach BABAIANTZ, 1948) Skelettveränderungen nachweisbar sind und röntgenologische Zusatzuntersuchungen (BIRKNER, BALZ, SCHMITT-ROHDE, 1957) in der Klinik nur in geringem Umfang angewendet werden. Besonders im Hinblick auf die Frühdiagnose und zur besseren Differenzierung der Osteopathien ist von BARTELHEIMER (1957) die Punktionsmethode des Beckenkamms entwickelt worden, die ganz entscheidend die Diagnostik der generalisierten halipenischen Osteopathien beeinflusst hat. Bei der histologischen Aufarbeitung des durch Knochenpunktion gewonnenen Materials ist in diesem Zusammenhang u.a. die Azanfärbung nach HEIDENHAIN (1913) angewandt worden, durch die man eine Aussage über Verän-

derungen der sog. Ultrastrukturdichte erhofft hat. Die mit dieser Doppelfärbung nachweisbaren Dichteunterschiede eines histologischen Knochenpräparates, die abhängig von der Größe der intermicellaren Räume sind, haben DETTMER und Mitarbeiter (1956) durch die unterschiedliche Teilchengröße des Azokarmins und des Anilinblaus erklärt. Die Interpretation der Ergebnisse mit dieser Färbung stützt sich auf die Auffassung v. MÜLLENDORFS (1923) und seiner Schüler, vor allem SEKI (1939), daß für histologische Färbungen mit sauren Farbstoffen die Durchträngungstheorie (physikalische Theorie) - Färbung auf dem Wege reiner Diffusion - zu vertreten sei. Spätere elektronenmikroskopische Untersuchungen von OKURA (1950) sowie OKURA und KICYAMA (1950) über den Unterschied der Teilchengröße der am häufigsten angewandten sauren Farbstoffe lassen nach der physikalischen Färbetheorie Rückschlüsse auf die Strukturdichte von Geweben zu (YASUDA, 1955). Der alte Streit über die Theorie der histologischen Färbung, der in der gegensätzlichen Deutung v. MÜLLENDORFS (1923) (physikalisch, Diffusion) und UNNAS (1923) (chemisch, Bindung) seinen Ausdruck findet, ist nie zugunsten der einen oder anderen Theorie für diese Färbung entschieden worden. In letzter Zeit haben besonders Beobachtungen von LORENTZ (1958) Zweifel erbracht, ob der Färbeausfall lediglich auf Diffusion beruhe. Auch BARTELHEIMER, DETTMER und SCHMITT-ROHDE berichten 1958, daß neben der Diffusion offenbar eine Adsorption eine Rolle spielt, ohne allerdings schon Beweise anführen zu können. Während LORENTZ (1960) histochemische Untersuchungen durchgeführt hat, um die Unklarheiten im Mechanismus der Azanfärbung aufzuklären, ist in dieser Arbeit der Versuch unternommen worden, mit einer photometrischen Methode (DETMER, HABERICH, SCHMITT-ROHDE, 1956) anhand von Modellversuchen den Färbemechanismus zu deuten. Es erscheint sinnvoll, eine Methode anzuwenden, die es erlaubt, das Objekt während

der Färbung zu beobachten und die Farbstoffein- und -auslagerung photometrisch quantitativ zu erfassen. Außerdem ist geprüft worden, ob eine neue Standardisierung der Azanfärbung möglich ist, die bei den augenblicklich meistens modifizierten und nach subjektiven Kriterien ausgeführten Techniken notwendig erscheint. Nur so kann ein verwertbarer Vergleich der Präparate erzielt werden.

II Material und Methodik

Entsprechend der Angabe HEIDENHAINS (1913) liegt der Hauptanwendungsbereich der Azanfärbung in der Darstellung der Bindegewebsstrukturen. Drei Grundelemente lassen sich in den verschiedenen Bindegewebsformen in unterschiedlicher Relation nachweisen:

1. "strukturlose" Grundsubstanz,
2. fibrilläre Elemente,
3. spezifische Zellen.

Von diesen drei Komponenten scheint uns die Grundsubstanz die brauchbarste für die vorzunehmenden Modellversuche zu sein. Als geeignetstes Substrat aus der Reihe der Bindegewebsarten hat sich wegen der einfachen Aufarbeitung hyaliner Knorpel (jugendlicher Rippenknorpel vom Menschen, Sektionsmaterial) angeboten. An seiner Grundsubstanz ist die Farbstoffeinlagerung und "Differenzierung" unter Färbebedingungen beobachtet und mikrophotometrisch gemessen worden.

Einige Knorpelstücke sind nach der Entnahme sofort in 10 %igem Formalin fixiert, andere vor der Fixierung einer insgesamt 14tägigen Fermenteinwirkung (modifiziert nach ROMEIS, 1948, bei 38° C im Thermostat) ausgesetzt worden.

Drei Fermentlösungen - Erneuerung nach jeweils 48 Stunden - sind verwendet worden:

1. Pepsin (Peps. sicc. 0,25; HCl 0,2 % 100 ml;
Toluol 3 ml). (Merck)
2. Trypsin (Tryps. sicc. 0,5; Natriumcarbonatleg.
0,3 % 100 ml; Toluol 3 ml). (Merck)
3. Testis-Hyaluronidase (Kinetin 3 Amp.; NaCl-
Leg. 0,9 % 100 ml) (Schering).

Die Kontrolle der Fermentwirkung ist an Präparaten, die nur mit den Lösungsmitteln der Fermente behandelt worden sind, erfolgt.

Gefrierschnitte einer Dicke von 20 μ sind dann zur Auswertung in eine Meßapparatur gelangt, deren Prinzip 1956 HABERICH angegeben hat.

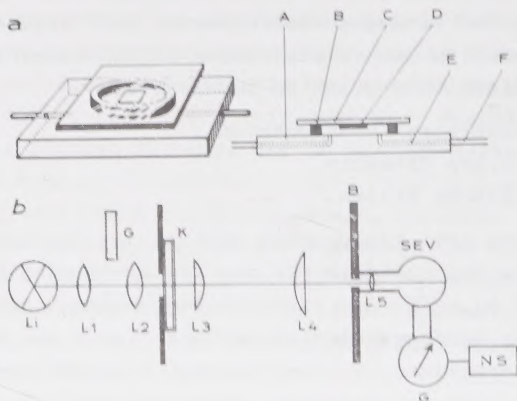


Abb. 1 a. Darstellung der Meßcuvette links in der Ansicht, rechts im Schnitt.
A Roden aus Plexiglas, F Messingring (Cuvettentiefe), C Objektträger, D histologisches Objekt, B Durchströmungskanal, F Anschluß des Kanals.
b. Schema der gesamten Meßanordnung.
L₁ Lichtquelle, L₁, L₂ Kondensor, L₃ Objektiv, L₄ Okular, B Projektionsfläche, L₅ Abbildungslinse des Sekundärelektronenvervielfachers (SEV), G Galvanometer, NS Nachlaufschreiber, G Grauglas, K Meßcuvette.

Mittelpunkt der Versuchsanordnung (Abb. 1) ist eine Meßkammer, die aus drei Teilen besteht:

1. Ein Boden aus Plexiglas,
2. Ein Distanzstück aus Messing,
3. Ein Glasträger für das histologische Objekt.

Der Boden hat im Bereich des Meßraumes außerhalb der optischen Abbildungszone drei Öffnungen, die mit entsprechenden Kanälen in Verbindung stehen. Über sie können beliebige Flüssigkeiten in den Cuvettenraum ein- bzw. abfließen. Das Distanzstück hat eine kreisrunde Öffnung und bestimmt mit seiner Dicke die Tiefe der Meßkammer. Über der Öffnung liegt dicht abschließend ein plangeschliffenes Deckglas, auf dessen Unterseite - also dem Kammerinnern zugewandt - das zu untersuchende histologische Objekt aufgebracht ist.

Bei den vorliegenden Untersuchungen beträgt die Kammertiefe stets 1 mm. Streng genommen müßte hiervon die jeweilige Dicke (ca. 20 μ) des histologischen Objektes abgezogen werden, so daß sich als wahre Kammertiefe ca. 980 μ ergeben. Bei den späteren Berechnungen ist dieser Unterschied von 2 % nicht berücksichtigt worden. Das zu untersuchende Präparat wird mit Hilfe dieser Anordnung auf einem weißen Projektionschirm abgebildet (Abb. 1), in dessen Zentrum - entsprechend der optischen Achse des Systems - sich eine kleine runde Öffnung von wenigen mm Durchmesser befindet. Hinter dieser Öffnung ist ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV, Multiplier) mit eigener Optik angebracht, die die Durchtrittsöffnung des Projektionschirms als sekundäre Lichtquelle auf der Kathode des SEV abbildet. Der Photostrom des SEV kann an einem Multiflexgalvanometer mit Lichtzeigerskala (Type MGP 2, Firma Bruno Lange, Berlin) abgelesen werden. Außerdem werden die Ausschläge dieses Galvanometers automatisch über einen Nachlaufschreiber (Modell 4, Firma Bruno Lange, Berlin) registriert. Die Stromversorgungsquellen für die optische Abbildung und den SEV sind spannungs-konstante Batterien. Auf diese Weise ist es durch ent-

sprechende Wahl von Objektiv, Okular, Projektionsabstand und Öffnung im Projektionsschirm möglich, in vorgegebenen kleinen runden Flächen des histologischen Objektes den durchtretenden Lichtstrom unter variierten experimentellen Bedingungen quantitativ zu messen.

Als Farbstoffe sind zur Anwendung gekommen:

1. Azokarmin G (0,1 g Azokarmin G in 100 ccm aqu. dest. und 1 ccm Eisessig).
2. Anilinblau-Goldorange G (0,5 g wasserlösliches Anilinblau und 2 g Goldorange G in 100 ccm aqu. dest. und 8 ccm Eisessig. Gebrauchslösung 3fach mit aqu. dest. verdünnt).

Die Konzentrationen der Farblösungen entsprechen den Gebrauchslösungen der Azanfärbung. Die Versuche werden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Azokarmin G gehört als saurer Farbstoff zu den Rosindulinen aus der Gruppe der Azinfarbstoffe. Die Struktur ist bis auf die Stellung der Sulfogruppen bekannt. Azokarmin ist gelbrot und wasserlöslich (HARMS Handbuch der Farbstoffe, 1958). Die Teilchengröße liegt zwischen der von Goldorange und Anilinblau (OKURA, 1950). Anilinblau ist gleichfalls ein saurer Farbstoff, der zu den Triarylmethanfarbstoffen gehört. Er liegt als Gemenge der Natrium-, Ammonium- und Calciumsalze von Di- und Trisulfosäuren des Triphenylpararosanilins vor (HARMS Handbuch der Farbstoffe, 1958). Anilinblau färbt das kollagene und reticuläre Bindegewebe, Azokarmin vorwiegend die Zellkerne an.

Die "Differenzierung" wurde durchgeführt mit:

1. Anilinalkohol (1 ccm Anilinöl auf 1000 ccm 90 % Alkohol).
2. Aqu. dest.
3. Pufferlösungen ($p_H 2$: Gemisch von 30,6 ml 0,1 mol Natriumzitatrlsg. und 69,4 ml 0,1 mol Salzsäure)
 $p_H 8$: Gemisch von 96,9 ml 1/15 mol sec. Natriumphosphat und 3,1 ml 1/15 mol prim. Kaliumphosphat).

Zur Eichung wird die Absorption der Farbstofflösungen konstanter Konzentrationen bei unterschiedlicher Kammertiefe gemessen (Abb. 2).

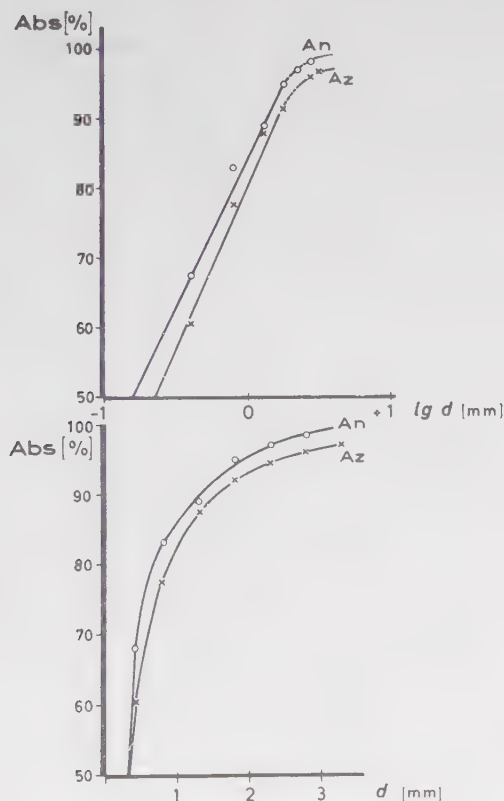


Abb. 2 Eichung der Farbstofflösungen (Azokarmin, Anilinblau) für verschiedene Kammertiefen. Untere Abb.: lineare Darstellung; obere Abb.: logarithmische Darstellung. Ordinaten: Absorption in %, Abszissen: Kammertiefe d in mm.

Die Versuche werden im Prinzip folgendermaßen durchgeführt:

Zunächst wird die Cuvette mit klarer Lösung durchströmt (Fußpunkt der registrierten Kurven). Dann läßt man die Farblösung einlaufen und verfolgt das Eindringen des Farbstoffes in den Schnitt über eine gewisse Zeit. Anschließend erfolgt eine Rückschaltung wieder auf klare Lösung. Man sollte nun erwarten, daß nach dieser Rückschaltung sprunghaft die Absorption wieder auf einen Wert abfällt, der der Schichtdicke des histologischen Schnittes entspricht. Das ist aber praktisch nie der Fall. Die Absorption ist unter solchen Bedingungen stets wesentlich größer. Um den Farbstoffgehalt des Präparates quantitativ zu charakterisieren, haben wir den Begriff der Äquivalenzschichtdicke eingeführt. Sie entspricht derjenigen Schichtdicke oder Kammertiefe, die bei der verwendeten Farbstoffkonzentration erforderlich ist, um einen der Absorption des histologischen Schnittes äquivalenten Wert zu erreichen. Zur Eichung beim Einzelversuch wird jedesmal der Ausschlag eines Graufilters konstanter Absorption (88 %) mitregistriert. Abb. 3 zeigt das Beispiel einer Registrierung.

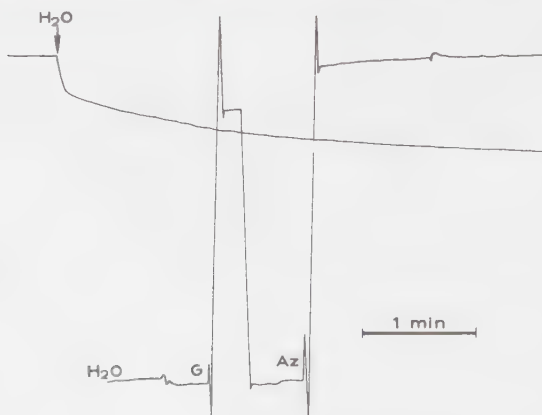


Abb. 3 Umzeichnung einer registrierten Kurve
(nähere Erläuterungen siehe Text)

Die Kurve ist von links nach rechts zu lesen und umfaßt ca. 2 Umläufe. Sie beginnt links unten mit der Aufzeichnung des Leerwertes (die Meßkammer enthält nur den Knorpelschnitt und die Differenzierungsflüssigkeit). Die nach rechts anschließende Zacke (G) entspricht der Absorption des geeichten Graufilters. Die hierbei auftretenden überschießenden Ausschläge nach oben und unten sind Artefakte und durch die Arbeitsweise des Nachlaufschreibers bedingt. Sie treten stets bei plötzlichen größeren Absorptionssprüngen auf. Anschließend beginnt bei Az die Durchströmung mit dem Farbstoff. Verfolgt man die obere Kurve bis zum rechten Rand und den sich anschließenden Teil links oben, so sieht man die weitere Zunahme der Absorption, die der Farbstoffeinlagerung in das Knorpelpräparat entspricht. Bei der Pfeilmarke H_2O beginnt die Durchströmung mit der Differenzierungslösung. Das Beispiel zeigt deutlich, daß die Absorption, wie schon erwähnt, trotz wassergefüllter Cuvette relativ hoch bleibt und auch nur langsam vermindert wird. Die Registriergeschwindigkeit beträgt für eine Umlaufbahn 5 Minuten (im Original 27,75 cm).

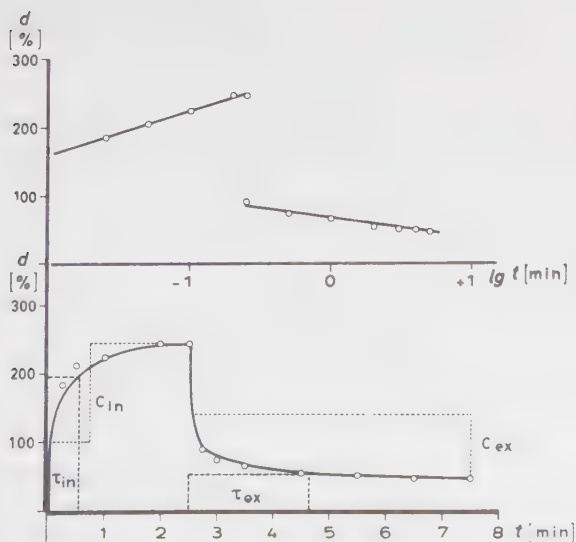


Abb. 4

Abb. 4 Umzeichnung der Kurvenübergänge (Farbstoffein- und Ausdiffusion) in linearer und logarithmischer Darstellung. Ordinate: Kammertiefe in % (= Äquivalenzschichtdicke) bezogen auf 1 mm Kammertiefe = 100 %. Abszisse: Zeit t in min bzw. lg. t . C_{in} eindiffundierte Farbstoffmenge, C_{ex} ausdiffundierte Farbstoffmenge. τ_{in} und τ_{ex} Zeitkonstanten des ein- bzw. ausdiffundierten Farbstoffes.

Zur genauen Auswertung wird jede Kurve an den entscheidenden Übergängen ausgemessen und nochmals umgezeichnet (s. Abb. 4). Die Absorptionen werden hierbei umgerechnet in Äquivalenzschichtdicken und diese wiederum in Prozenten der konstanten Kammertiefe von 1 mm angegeben. So ist es möglich, die Werte verschiedener Versuche zu vergleichen. Bei der Umrechnung der Kurvenausschläge in Absorption ist das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz zu berücksichtigen (KORTUM, 1955). Der bis auf die hohen Absorptionswerte offensichtlich logarithmische Verlauf der Übergänge von Farbstoffein- und -auswanderung läßt sich in einfacher Weise bestätigen, wenn man die Kurven halblogarithmisch aufträgt. Es ergeben sich, wie erwartet, gerade Linien (s. Abb. 4).

Da dieser Vorgang der Farbstoffein- bzw. -auslagerung große Ähnlichkeit mit der Auf- bzw. Entladung eines Kondensators hat, haben wir versucht, dieses elektrische System als analoges Modell zu benutzen. Wie sich zeigen wird, sind so Rückschlüsse auf Größen möglich, die nicht unmittelbar gemessen worden sind. Wie bei den elektrischen Vorgängen am Kondensator streben auch die hier aufgezeichneten Kurven asymptotisch Sättigungswerten zu, die jeweils dem Zustand der Sättigung mit dem Farbstoff (Ladungszustand) bzw. dem Zustand entsprechen, der sich nach dem Ausdiffundieren des Farbstoffes einstellt und bei allen Versuchen dadurch charakterisiert ist, daß das histologische Substrat eine gewisse Farbstoffmenge festhält. Mit den

Absorptionsmessungen und den Umrechnungen in Äquivalenzschichtdicken erhält man vergleichbare Werte über die Farbstoffmengen, die eindiffundieren, ausdiffundieren bzw. im Schnitt zurückbleiben. In dem elektrischen Analogon entsprechen diese verschiedenen Farbstoffmengen den Ladungsmengen Q , die durch eine bestimmte Spannung (U) in einem Kondensator mit einer gewissen Kapazität (C) gespeichert werden. Zwischen diesen Größen gilt die einfache Beziehung: $Q = U \cdot C$. U entspricht bei den durchgeführten Versuchen der Farbstoffkonzentration und ist konstant, weil stets dieselbe Konzentration benutzt worden ist. Da bei den Versuchen trotzdem verschieden große Farbstoffmengen gefunden worden sind, können diese nur durch unterschiedliche Kapazitäten des histologischen Präparates bedingt sein. Zur praktischen Bestimmung der Kapazität subtrahiert man vom Sättigungswert die Kamertiefe ($1 \text{ mm} = 100 \%$). Dies ist die relative Größe der eindiffundierenden Farbstoffmenge (C_{in} , s. Abb. 4). Beim Vorgang der Rückdiffusion des Farbstoffes ergibt sich in entsprechender Weise die relative Menge des ausdiffundierenden Farbstoffes als C_{ex} . Außerdem ist an den Kurven noch die Zeitkonstante τ abgemessen worden, die in Verbindung mit den Kapazitäten eine Aussage über die Widerstände erlaubt. Es gilt die Beziehung: $\tau = R \cdot C$. Bei der Eindiffusion wird τ bei $2/3$ -Sättigung und beim Ausdiffundieren bei Abfall auf $1/3$ der Kapazität abgelesen. R gibt in unserem Zusammenhang ein relatives Maß für den Diffusionswiderstand, während der reziproke Wert $1/R$ ähnlich der elektrischen Leitfähigkeit das Diffusionsvermögen (Diffusibilität) charakterisiert.

III Kritik der Methode

Der geschilderten Methode haften in der Praxis durch einen absichtlich einfach gehaltenen apparativen Auf-

wand gewisse Mängel an, die aber die in dieser Arbeit angestrebten Ziele nicht beeinträchtigen. Die verwendeten Farbstoffe Azokarmin G und Anilinblau-Goldorange G sind Gebrauchspräparate der Histologie und infolgedessen nicht völlig frei von Unreinheiten. Es ist aber gerade darauf Wert gelegt worden, die in der Praxis üblichen Farbstoffe zu verwenden. Alle Durchströmungsflüssigkeiten werden stets auf Zimmertemperatur gehalten, um einen Einfluß der Temperatur auf die Farbstoffbindung zu verhüten. Für Azokarmin ist ein solcher Einfluß erst bei einer Temperatursteigerung auf 56° C erwiesen (ROMEIS, 1948).

Während der Messung muß darauf geachtet werden, daß durch die Flüssigkeitsströmung in der Cuvette der Schnitt nicht verschoben oder abgelöst wird. Solche Ereignisse sind aber auf dem Projektionsschirm sofort zu erkennen und können entsprechend berücksichtigt werden.

IV Ergebnisse

Zum Beweis einer sicheren Reproduzierbarkeit der Absorptionskurven ist zu Beginn der Versuche die Färbung der Knorpelgrundsubstanz mit Azokarmin und Anilinblau-Goldorange G und deren Ausspülbarkeit (Differenzierung) mit aqu. dest. gemessen worden. Zahlreiche Messungen am Anfang unserer Untersuchungen haben ergeben, daß die Kurven für einen Färbevorgang gut übereinstimmen, so daß die Zahl der Einzelversuche zur Prüfung der verschiedenen Phasen der Azanfärbung relativ niedrig sein kann. Schon bei diesen ersten Experimenten ist eine deutliche Ausspülbarkeit des Anilinblaus durch aqu. dest. aus dem Knorpelschnitt aufgefallen (Abb. 5), so daß bei diesem Farbstoff auch im Verlauf der weiteren Messungen aqu. dest. als Differenzierungsflüssigkeit angewandt worden ist.

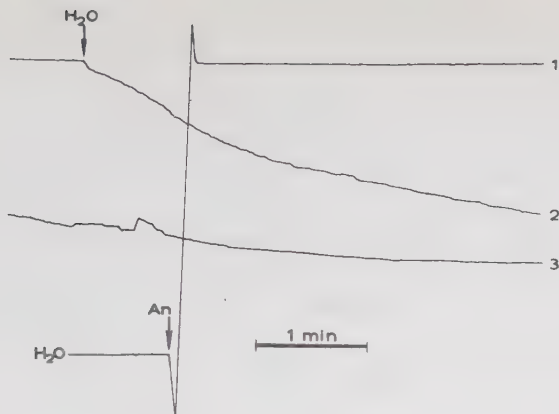


Abb. 5 Ausdiffusion von Anilinblau durch aqu. dest. (Umzeichnung einer registrierten Kurve).

Die in der Tabelle I aufgeführten Versuchsbedingungen haben sich aus den einzelnen Arbeitsgängen der Azanfärbung ergeben.

Nr.	Vorbehandlung		Cuvetten-Messung	
	Färbung	Differenzierung	Färbung	Differenzierung
1			Azokarmin	Puffer pH 2
2			Azokarmin	Farbstofflösungs- mittel
3			Azokarmin	Puffer pH 8
4			Azokarmin	Anilinalkohol
5	60' 60° Essig- säure		Azokarmin	Anilinalkohol
6	Hyaluronidase		Azokarmin	Anilinalkohol
7	Pepsin		Azokarmin	Anilinalkohol
8	Trypsin		Azokarmin	Anilinalkohol
9			Anilinblau	Farbstofflösungs- mittel
10	60' 60° Essig- säure, Azokarmin	Anilinalkohol	Anilinblau	Aqu. dest.
11	60' 60° Essig- säure, Azokarmin	Anilinalkohol, PW 2 ⁿ	Anilinblau	Aqu. dest.
12	Azokarmin	Anilinalkohol	Anilinblau	Aqu. dest.
13	Azokarmin	Anilinalkohol, PW 5'	Anilinblau	Aqu. dest.
14	Azokarmin	Anilinalkohol, PW 2 ⁿ	Anilinblau	Aqu. dest.

Tab. I



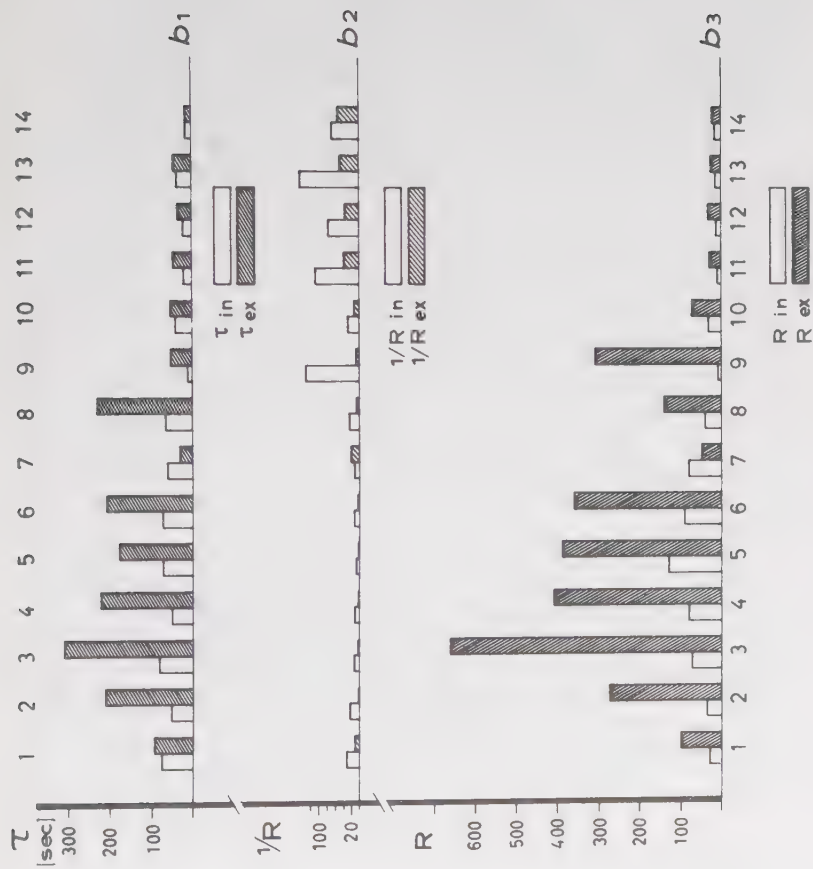


Abb. 6

Bei der graphischen Darstellung sind jeweils die Azokarmin- und die Anilinblau-Versuche unabhängig von der Phasenfolge der Azanfärbung zusammengefaßt worden. Alle Meßergebnisse der in Tabelle I aufgeführten Versuchsbedingungen sind zahlenmäßig in Tabelle II

	C_{in} ‰ Abs.	C_{ex} ‰ Abs.	$C_{ex} \%$ von C_{in}	Ab- sorp- t. ‰	τ_{in} (sec)	τ_{ex} (sec)	R_{in}	R_{ex}	$1/R_{in}$	$1/R_{ex}$
1	2,62	0,9	34,4	65,6	78	90	29,7	100,0	33,6	10,0
2	1,43	0,76	53,1	46,9	55	210	38,4	276,3	26,0	3,7
3	1,14	0,48	42,1	57,9	81	318	71,0	662,5	14,1	1,5
4	0,66	0,54	81,8	18,2	54	221	81,8	409,2	12,2	2,4
5	0,56	0,45	80,4	19,6	72	174	128,6	386,6	7,7	2,9
6	0,76	0,65	85,5	14,5	75	234	98,7	360,0	10,1	2,7
7	0,74	0,61	82,4	17,6	60	30	81,1	49,2	11,4	20,3
8	1,51	1,4	92,7	7,3	63	198	41,6	141,4	24,0	7,7
9	1,52	0,16	10,4	89,6	12	51	7,8	318,8	128,2	3,0
10	1,19	0,8	67,2	32,8	42	57	35,2	71,2	28,4	14,0
11	2,16	1,70	78,7	21,3	21	45	9,7	26,5	103,1	38,0
12	1,46	1,0	68,5	31,5	21	30	14,4	30,0	69,4	33,3
13	2,4	1,80	75,0	25,0	39	42	16,2	23,3	60,9	42,9
14	0,94	0,74	78,7	21,3	15	15	15,9	20,3	62,9	49,0

bzw. graphisch in Abb. 6 wiedergegeben worden. Bei dieser Farbstoffgegenüberstellung sind schon in der Gesamtheit einige der unterschiedlichen Farbstoffeigenschaften des Azokarmins und des Anilinblaus zu erkennen. Bei Azokarmin ist die diffusible Farbstoffkomponente stets größer als bei Anilinblau, wie aus den vergleichbaren Versuchen ersichtlich ist (vgl. Vers. 2 und 9). Da auch die Zeitkonstante τ sowohl

beim Einströmen des Farbstoffes (τ_{in}) als auch beim Differenzieren (τ_{ex}) bei Azokarmin erheblich größer als bei Anilinblau ist, kommt es wegen der schon genannten Beziehung $R = \tau/C$ bei Azokarmin zu größeren Widerständen und daher kleinerem $1/R$ (Diffusibilität) als bei Anilinblau.

Betrachten wir nun die Versuche im einzelnen und hierbei zunächst die mit Azokarmin. Allen Meßbedingungen ist gemeinsam, daß weniger Farbstoff aus dem Präparat eliminiert werden kann als eingelagert wird: $C_{ex} < C_{in}$. Es bleibt also stets ein Farbstoffrest in dem histologischen Schnitt, der auch durch längere Differenzierung nicht herausgespült werden kann. Selbst dem Anilinalkohol, der im Vergleich zu den Versuchen mit anderen Differenzierungslösungen fast doppelt so viel Azokarmin aus dem Knorpelschnitt lösen kann, gelingt keine vollständige Elimination (vgl. Vers 2 mit 4, 5, 6, 7, 8). Die Knorpelschnitte sind auch nach abgeschlossener Differenzierung rosa gefärbt. Die Farbstoffeinlagerung kommt gegen einen geringeren Widerstand (R_{in}) zustande als die Ausspülung der diffusiblen Komponente gegen ihren Diffusionswiderstand: $R_{in} < R_{ex}$. Die Ausdiffusion gelingt dabei nur langsam (Zeitkonstante τ_{ex} groß), so daß der Quotient $1/R$ - ein Maß der Diffusibilität - klein wird.

Bei den durchgeführten p_H -Versuchen zeigen sich einige Gesetzmäßigkeiten: mit fallendem p_H (8; 5,8; 2) wird die eingelagerte Farbstoffmenge (C_{in} und C_{ex}) größer und der Widerstand gegen die Farbstoffein- oder -auslagerung (R_{in} , R_{ex}) kleiner (Vers. 1, 2, 3). Da der Anreicherungsfaktor (AF) aus der maximal eingeströmten Farbstoffmenge (C_{in}) berechnet wird, ist auch hier eine p_H -Abhängigkeit festzustellen: bei fallendem p_H ist der Anreicherungsfaktor größer (Abb. 7).

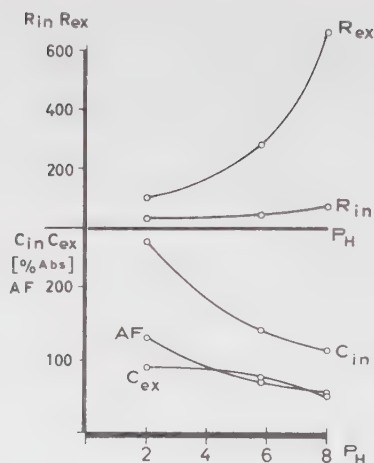


Abb. 7 Einfluß des p_H -Wertes auf die verschiedenen Größen (nähere Erläuterungen siehe Text).

Bei den Messungen wird deutlich, daß die Vorbehandlung des Knorpelpräparates mit auf 60°C erwärmter Essigsäure (LORENTZ, 1958) die Meßergebnisse im Vergleich zur Färbung bei Zimmertemperatur von 20°C nicht beeinflusst (vgl. Vers. 4 mit 5).

Vergleicht man die Meßergebnisse des normalen Färbevorganges der Azanfärbung (4) mit den Versuchen nach fermentativer Vorbehandlung des Präparates (6, 7, 8), so ist die Gegenüberstellung von Versuch 4 mit Versuch 8 (Trypsin) besonders eindrucksvoll. Nach Fermentvorbehandlung strömt etwa doppelt so viel Farbstoff in das Präparat bei halb so großem Widerstand. Der Anreicherungsfaktor ist entsprechend doppelt so groß. Auch die diffusible Komponente des Azokarmins nimmt erheblich zu (C_{ex} 93 %) bei sehr niedrigem Diffusionswiderstand (R_{ex}). Bei den Messungen nach Pepsin- und Hyaluronidase-

Vorbehandlung sind derart auffällige Ergebnisse nicht zu beobachten (vgl. Vers. 4 mit 6 und 7).

Auch bei den Anilinblau-Versuchen haben die Messungen Ergebnisse gebracht, die die Problematik des zweiten Teiles der Azanfärbung aufzeigen. Es muß vorausgeschickt werden, daß hierbei vor den meisten Versuchen bereits ein Färbeprozess auf das histologische Präparat eingewirkt hat (Tab. I), wie das bei der Routine-Azanfärbung ebenfalls durchgeführt wird. Es gilt ja, herauszufinden, welche Phase der Azanfärbung die den Färbefall entscheidende Beeinflussung des histologischen Schnittes bewirkt. Die Wahl der Vorbehandlungen ist also nicht willkürlich getroffen worden, sondern den einzelnen Arbeitsgängen der Azanfärbung angeglichen.

Vergleicht man zunächst noch einmal den Versuch 9 mit Versuch 2 und den übrigen Anilinblau-Messungen (10, 11, 12, 13, 14), so fällt der große Unterschied zwischen ein- und ausgelagerter Farbstoffmenge (C_{in} und C_{ex}) auf. Nur 10 % des eingeströmten Anilinblaus können aus dem Präparat eliminiert werden, beim Azokarmin 53 %, bei den anderen Anilinblau-Bedingungen bis zu 80 %. Die diffusible Komponente nimmt also beim Anilinblau, ganz gleich nach welcher Vorbehandlung, grundsätzlich zu, auch unter der Berücksichtigung der Differenzierung mit aqu. dest. Wie beim Azokarmin ist C_{ex} stets kleiner als C_{in} , also auch hier ist keine vollständige Farbstoffelimination zu erzielen. Da die Zeitkonstante beim Entfärbungsvorgang stets größer oder höchstens gleich ist als beim Einströmen des Anilinblaus (Abb. 6), wird auch der Diffusionswiderstand größer als der Widerstand beim Einlagern des Farbstoffes (Abb. 6). Da im Vergleich zu den Azokarminversuchen die Zeitkonstanten sowohl für die Färbung als auch für die Entfärbung niedriger liegen, wird für den diffusiblen Farbstoffanteil die Diffusibilität ($1/R$) groß. Die Wärmavorbehandlung hat auch auf die Anilinblaubindung an das Substrat keinen Ein-

fluß (vgl. Vers. 10 mit 12). Auch unter der Einwirkung der Phosphorwolframsäure macht sich der Wärmeeinfluß nur dahingehend bemerkbar, daß offenbar mehr Farbstoff eingelagert werden kann (vgl. Vers. 11 mit 14). Eine zeitliche Abhängigkeit der Einwirkung der Phosphorwolframsäure - 5 Min. oder 2 Stunden - läßt sich nicht beweisen (vgl. Vers. 11 mit 13). Beim Knorpel hat die Phosphorwolframsäure offenbar keinen Einfluß auf die einzelnen Phasen der Azanfärbung.

Mit Hilfe der Äquivalenzschichtdicke für den Absorptionswert nach dem Ausdiffundieren des Farbstoffes läßt sich noch die Farbstoffanreicherung (Anreicherungsfaktor) im histologischen Schnitt bestimmen. Sie ist zu errechnen aus der Beziehung $C_{in}/20$, wobei der Wert 20 der Dicke des histologischen Schnittes in μ entspricht. Bei reiner Diffusion hätte stets ein Wert gemessen werden müssen, der dem 50. Teil der Kammer-tiefe (1 mm) entspricht. Das ist aber nie der Fall, die Werte sind stets höher und betragen minimal das 30fache, maximal der 130fache (Abb. 6).

Aus der zeitlichen Auswertung der Originalkurven sind bei entsprechender Zeitschreibung ohne weiteres Färb- und Differenzierungszeiten abzulesen. Das ist wichtig, um evtl. zu einer neuen Standardisierung der Azanfärbung zu gelangen. Nach etwa 3 Min. ist der Sättigungswert für die Einlagerung von Azokarmin und Anilinblau in den Knorpelschnitt erreicht. Die Differenzierung ist nach spätestens 20 Min. abgeschlossen. Beide Zeitwerte ergeben sich bereits bei Zimmertemperatur.

V Diskussion

Zu Beginn der Besprechung sei nochmals betont, daß die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einen Vergleich zu früheren Untersuchungen zum Mechanismus der Azanfärbung (DETTMER, HABERICH, SCHMITT-ROHDE, 1956, LORENTZ, 1958, 1960), die sämtlichst am Knochen durch-

geführt worden sind, nur bedingt zulassen. Praktische Konsequenzen für die tägliche Routinearbeit in den histologischen Labors dürften sich erst nach Überprüfung und evtl. zusätzlichen Untersuchungen am Knochen ergeben.

Geht man noch einmal auf die Einführung der Azanfärbung in die Diagnostik der generalisierten halipenischen Osteopathien durch BARTELHEIMER und seinen Arbeitskreis ein, so ist festzustellen, daß durch diese Methode die bis dahin eindrucksvollsten Ergebnisse auf Grund einer histologischen Färbung erzielt werden können. Sehr klar sind für die einzelnen Formen dieser Krankheiten charakteristische Färbeunterschiede für den Knochen aufgezeigt worden, die erst die Voraussetzung für eine Diagnosestellung geschaffen haben. Bis dahin ist die von der Mallory'schen Bindegewebsfärbung abgeleitete Doppelfärbung nach HEIDENHAIN (1913, 1915) zur besonders markanten färberischen Darstellung des Bindegewebes benutzt worden, mit Azokarmin G als Kernfarbstoff und Anilinblau zur Plasmafärbung. Um die pathologisch-anatomischen Skelettveränderungen bei den halipenischen Osteopathien (z.B. Looser'sche Umbauzonen, Rarefizierung der Knochenbälkchen, breite osteoide Säume) nachweisen zu können, ist es BARTELHEIMER und seiner Schule aber weniger auf die kontrastreiche Färbung der Kerne und des Plasmas angekommen, als vielmehr auf die unterschiedliche Anfärbbarkeit des Knochens schlechthin. Die Plaufärbung der osteoiden Säume und die Rotfärbung des schon verkalkt gewesenen Knochens ist entsprechend der physikalischen Färbungstheorie auf die unterschiedliche "Dichte" dieser Substrate zurückgeführt worden. DEITNER, HABERICH und SCHMITT-FÖHDE (1956) haben als erste diese Ergebnisse der Azanfärbung experimentell geprüft, wobei sie neben histologischen Methoden auch eine optische Meßmethode zu Dichtebestimmungen am Knochen hinzugezogen haben. Sie haben dabei die Ergebnisse von KUMA und KOYAMA (1950) über die Größe von Farbstoffteilchen zugrunde-

gelegt. Diese zum Teil elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind auch von YASUDA (1955) bestätigt worden. DETTMER (1956) und Mitarbeiter schließen aus der Geschwindigkeit, mit der ein Farbstoff seinen Sättigungswert im Präparat erreicht, auf dessen Dichte. LÖRENTZ (1958) hat versucht, diese Befunde zu analysieren, indem er mit der gleichen optischen Meßmethode Untersuchungen an der Kompakta und Spongiosa des Knochens angestellt hat, deren Dichteunterschiede augenfällig gewesen sind. LÖRENTZ (1958) bezeichnet die Azanfärbung als Synthese zwischen Diffusion einerseits und chemischer oder adsorptiver Bindung andererseits. Bei seinen späteren histochemischen Untersuchungen verweist er - wie auch HEIDENHAIN (1913) - auf die wichtige Aufgabe der Phosphorwolframsäure, die vor allem für die Anilindlaufärbung zusätzliche Bindungsmöglichkeiten schaffe. Für die Azokarminaufnahme eines Präparates sei das heiße Färbebad, das die Kittsubstanz des Knochens verändert, verantwortlich.

Da weder DETTMER und Mitarbeiter noch LÖRENTZ mit ihren Untersuchungen den Mechanismus der Azanfärbung endgültig geklärt haben, ist die Arbeit auf diesem Gebiet durch die hier vorgelegten Modellversuche weitergeführt worden. Während die früher vorgenommenen Untersuchungen alle am Knochen ausgeführt worden sind, ist in der vorliegenden Arbeit bewußt auf Modellversuche am hyalinen Knorpel zurückgegriffen worden. Dabei sind zunächst Versuche mit Agar oder Gelatine als homogenem Material aus technischen Gründen mißlungen, ehe sich der verwendete Knorpel als brauchbar erwiesen hat. Bei der Interpretation der Messergebnisse von Färbung und Entfärbung dieser Knorpelpräparate haben wir uns nicht nur auf die deskriptive Auswertung der aufgezeichneten Absorptionskurven beschränkt, sondern auch eine rechnerische Analyse, soweit wie möglich, vorgenommen. Die dabei ermittelten

Werte verdeutlichen doch wesentlich exakter - wenn auch nur mit relativen Zahlenangaben - was während der einzelnen Arbeitsgänge der Azanfärbung im Knorpelschnitt vorgeht. So zeigt die Prüfung der Diffusionsverhältnisse beim Azokarmin (Vers. 2 der Abb. 6), daß zwar 53 % des Farbstoffes durch das Lösungsmittel (Essigsäure) eliminiert werden, aber ein nicht unerheblicher Rest im Präparat bleibt, also gebunden wird. Ein reiner Diffusionsfarbstoff liegt somit nicht vor, denn auch bei der Anwendung von Anilinalkohol, einem wesentlich stärkeren Differenzierungsmittel, bleiben immer noch ca. 29 % des Farbstoffes im histologischen Schnitt zurück. Ein weiterer Beweis der festen Bindung des Azokarmins ist auch die Bestimmung des sog. Anreicherungsfaktors. Die zum Teil erhebliche Farbstoffeinlagerung in die Knorpelschnitte - bis zu 130fach - ist durch alleinige Diffusion nicht zu deuten und spricht gegen die Durchträngungstheorie der Azanfärbung (v. MÖLLER-DORF, SEKI). Die Anreicherung des Azokarmins im Knorpel ist nur durch eine feste Bindung des Farbstoffes an die innere Oberfläche des Substrates zu erklären, wobei über die Art keine Aussage gemacht werden kann. Durch Variation geeigneter Differenzierungsflüssigkeiten wäre u.U. auch die Art der Bindung zu klären. Eine p_H -Abhängigkeit ist nach den vorliegenden Meßergebnissen anzunehmen und bestätigt die Resultate von LORENTZ (1958). Die Befunde unserer Versuchsgruppen 1, 2 und 3 zeigen jedoch klar, daß mit zunehmender Alkalisierung sowohl C_{in} , C_{ex} als auch der Anreicherungsfaktor abfallen. Dies könnte durch eine Quellung der Struktureiweiße und damit einhergehender Verkleinerung der Diffusionsräume bedingt sein. Außerdem muß man hierbei vielleicht berücksichtigen, daß die von uns verwendeten Farbstoffe selbst als Ionen in Erscheinung treten und eine entsprechende Abhängigkeit ihres Dissoziationsgrades von p_H vor-

legen könnten. In diesem Falle würde also eine Änderung der elektrischen adsorptiven Bindung resultieren. Wir möchten gerade aus diesem Ergebnis schließen, daß der elektrische Typ der Adsorptionsbindung bei unseren Farbstoffen vorliegen könnte (heteropolarer Bindungstyp).

Richtungsweisend für eine Vereinfachung der Azanfärbung dürfte auch das Ergebnis der Azokarmin-einlagerung in das Knorpelpräparat nach vorhergehender Einwirkung von dem auf 60° C erwärmten Lösungsmittel des Azokarmins (Essigsäure) sein. Das warme Färbebad hat LORENTZ (1960) als wesentlich für die Azokarminbindung bei der Azanfärbung des Knochens angesehen. Bei unseren Messungen ist kein Effekt erzielt worden im Vergleich zu den Färbungen bei Zimmertemperatur von 20° C. Ein Vergleich der Bedingungen 4 und 5 lehrt, daß die Absorption von Azokarmin durch die einstündige Erwärmung von Essigsäure nicht verändert wird (18,2 und 19,6). Das gleiche ergibt sich für Anilinblau, wenn man die Bedingungen 12 und 10 vergleicht (31,5 und 32,8).

Die größte Ungenauigkeit der Azanfärbung liegt im Differenzierungsvorgang, der bisher nach rein subjektiven Kriterien, wie z.B. "bis keine Farbwolken mehr abgelöst werden können" oder "bis die Kerne leuchtend rot gefärbt sind" (ROMEIS, 1948), durchzuführen ist. Diese Unsicherheit rührt daher, daß die Differenzierung willkürlich unterbrochen und nicht zuende geführt wird. Sicher ist die Azokarminfärbung nach vollständiger Anilinalkoholdifferenzierung am Knorpel nicht sehr eindrucksvoll - die Präparate sind rosa gefärbt - aber im Interesse einer anzustrebenden neuen Standardisierung der Azanfärbung ist es notwendig, auf Grund von Messungen einheitliche Differenzierungszeiten anzugeben, damit man endlich zu vergleichbaren Färberesultaten gelangt. Das Azokarmin ist nach längstens 20 Min. aus dem

Knorpelschnitt durch Anilinalkohol eliminiert (Abb. 3). Um günstigere Färbungen zu erzielen, bietet sich für die Zukunft einmal der Weg über weniger drastische Differenzierungslösungen, wie z.B. dem Azokarminlösungsmittel, oder einer einheitlich festgelegten unvollständigen Differenzierung durch Anilinalkohol bis etwa 10 Min. Beide Wege werden zur Zeit geprüft.

Die Fermentversuche sollen zeigen, ob Rückschlüsse auf die Substratdichte beim Knorpel durch die Azanfärbung möglich sind, was zumindest für das Azokarmin als überwiegenden Diffusionsfarbstoff erwartet werden kann. Bei Hyaluronidase und Pepsin sind die Meßergebnisse im Vergleich zu nicht vorbehandeltem Knorpel nicht unterschiedlich ausgefallen. Auffällig aber ist die Wirkung des Trypsins, das offensichtlich durch die Andauung zusätzlich anfärbbare "Räume" für das Azokarmin schafft bzw. die innere Oberfläche des Substrates vergrößert. Eine vermehrte feste Bindung des Farbstoffes scheidet aus, da die größere Farbstoffmenge, wie die Messungen zeigen, nur im Anteil der diffusiblen Komponente erscheint (Abb. 6). Auch der Diffusionswiderstand ist bei diesem Versuch im Vergleich zu den übrigen sehr niedrig. Der Färbefall wird also nur von der Präparatdichte beeinflusst. Dieser Befund ist nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß die proteolytische Aktivität von Trypsin wesentlich größer als von Pepsin ist.

Bevor auf den zweiten Teil der Azanfärbung am Knorpel eingegangen wird, soll noch kurz zum Färbeverhalten des Anilinblaus am Knorpel isoliert Stellung genommen werden. Der Diffusionsversuch (Nr. 9 der Abb. 6) mit dem Farbstofflösungsmittel (Essigsäure) zeigt deutlich, daß Anilinblau überwiegend fest im Substrat gebunden wird, denn 90 % des Farbstoffes können nicht aus dem histologischen Schnitt eliminiert werden. Der Anreicherungsfaktor ist hoch (etwa 75fach), was bei der festen Bindung auch zu erwarten ist. Dieses Verhalten

ändert sich in erstaunlichem Maße im Verlauf der üblichen Arbeitsgänge der Azanfärbung. Ganz gleich, welcher Vorbehandlung das Knorpelpräparat unterzogen worden ist, die diffusible Komponente des Anilinblaus nimmt stets zu. Es können dann bis zu 75 % des Farbstoffes bei der Differenzierung mit aqu. dest. aus dem histologischen Schnitt herausgelöst werden. Durch die Vorbehandlung wird offenbar ein großer Teil der Bindungsorte bereits blockiert. Interessant ist dabei die nach den vorliegenden Messungen beim Knorpel beobachtete Bedeutungslosigkeit der Phosphorwolframsäure, der in den bisher erschienenen Arbeiten (HEIDENHAIN, 1913; LORENTZ, 1958) eine entscheidende Rolle zuerkannt worden ist. Aus unseren Messungen kann man nur den Schluß ziehen, daß ausgehend von dem Versuch 12 (keine Phosphorwolframsäure) die Behandlung mit Phosphorwolframsäure (13, 14) den im Präparat gebundenen Farbstoffanteil mit zunehmender Einwirkungsdauer sogar herabsetzt. Die entsprechenden Adsorptionswerte sind 31,5; 25,0 und 21,3.

Zusammenfassend können sich daher für eine sinnvolle Azanfärbung aus den am Knorpel erzielten Ergebnissen Beschränkungen auf folgende Arbeitsgänge ergeben, die gleichzeitig als Versuch einer neuen Standardisierung dieser Färbung vorgeschlagen werden:

1. Färbung mit Azokarmin bei 20° C für 10 Min.
2. Differenzierung mit Essigsäure für 20 Min. oder mit Anilinalkohol für 10 Min.
3. Färbung mit Anilinblau bei 20° C für 10 Min.
4. Differenzierung mit aqu. dest. für 10 Min.

Wir werden später berichten, ob und welche Aussagen mit dieser Doppelfärbung möglich sind, besonders im Hinblick auf die generalisierten halipenischen Osteopathien. Durch die Zunahme der diffusiblen Komponente des Anilinblaus nach den genannten Vorbehandlungen sind auch für diesen Farbstoff Rückschlüsse auf die Substratdichte erneut zu diskutieren, wie es auch schon DETTMER und Mitarbeiter (1956) getan haben.

Gerade für den Nachweis der Dichteunterschiede eines Präparates, um den es bei der Diagnostik der halipenischen Osteopathien durch die Azanfärbung u. a. geht, ist jedoch wegen der Kombination von Diffusion und fester Bindung, die sich auch aus unseren Versuchen für Azokarmin und Anilinblau ergibt, bei beiden Farbstoffen die Schwierigkeit der Interpretation des Färbungsergebnisses zu betonen. Die einfache Postulierung, daß der Farbstoff mit kleiner Teilchengröße (Azokarmin) die engen Räume ausfüllt, Anilinblau mit größeren Farbstoffteilchen aber die weiten, ist in dieser Form nicht aufrechtzuerhalten, weil keine reine Diffusion vorliegt.

VI Zusammenfassung

Durch mikrophotometrische Modellversuche am hyalinen Knorpel ist der Mechanismus und der zeitliche Verlauf der Azanfärbung in seinen einzelnen Phasen untersucht worden. Dabei zeigt sich,

1. daß Azokarmin wegen der erheblichen Farbstoffanreicherung im histologischen Präparat kein reiner Diffusionsfarbstoff sein kann.
2. Für die Azokarminfärbung besteht eine p_H -Abhängigkeit. Mit fallendem p_H nimmt die in den Schnitt eingelagerte Farbstoffmenge zu.
3. Für die Azokarminfärbung des Knorpels ist das heiße Färbebad belanglos.
4. Durch Trypsinvorbehandlung der Knorpelpräparate ist die Abhängigkeit des Färbeausfalles von der Präparatdichte nachzuweisen.

5. Die Ausgefilterbarkeit des Anilinblaus aus dem Knochenschnitt nimmt durch die zum Ablauf der Azanfärbung gehörenden Arbeitsschritte zu, offenbar durch eine Besetzung adsorptiver Bindungen durch Azokarmin.
6. Die Phosphorwolframsäure schafft in diesem Zusammenhang keine zusätzlichen Bindungsmöglichkeiten für Anilinblau.
7. Der Färbungsausfall ist abhängig von der zwischen beiden Färbungen einwirkenden Differenzierungsflusigkeit bzw. von der Differenzierungszeit.
8. Es ist deshalb ein Vorschlag zur neuen Standardisierung der Azanfärbung gemacht worden.
9. Die Azanfärbung ist sowohl für Azokarmin als auch für Anilinblau eine Kombination von Diffusion und fester Bindung in unterschiedlicher Relation. Aussagen über die Dichte eines Präparates sind daher nur bedingt zu erhalten.

VII Literaturverzeichnis

1. Babaianz, L.: Les ostéopathies atrophiques. J. de radiol et d'électrol. 29 (1948): 333
2. Balz, G., Birkner, R., Schmitt-Rohde, J.M.: Über die calcipenischen Osteopathien und ihre Diagnostik mit Hilfe eines besonderen Röntgenverfahrens. Ärztl. Wochenschrift, 12. Jahrgang, Heft 9/10 (1957)
3. Bartelheimer, H. und Schmitt-Rohde, J.M.: Die Biopsie des Knochens als differentialdiagnostische klinische Methode. Klin. Wschr., 35. Jahrgang, 9 (1957) 429
4. Bartelheimer, H., Pettmer, N. und Schmitt-Rohde, J.M.: Die direkte Diagnostik der Myelosklerosen als Grundlage pathogenetischer Betrachtungen. Klin. Wschr., 36. Jahrgang, 15 (1958) 706

5. Dettmer, W., Schmitt-Rohde, J.M. und Haberich, F.J.:
Über histologisch und mikrodensometrisch nachweisbare postmortale Veränderungen der Knochengrundsubstanz.
Virchows Arch. path. Anat. 328, 324 (1956)
6. Harms Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie,
Teil II, 3 (1958) 239
Staufen Verlag Kamp Lintfort
7. Heidenhain, M.: Über die Bearbeitung d. Sehnen zu Kurzscheiben, insbes. über die Verwendung des Rutheniumrotes u. der Mallory'schen Bindegewebsfärbung.
Z. W. M., Bd. 30 (1913)
8. Heidenhain, M.: Über die Mallory'sche Bindegewebsfärbung mit Karmin u. Azokarmin als Vorfarben.
Z. W. M., Bd. 32 (1915) 361
9. Kortüm, G.: Kolorimetrie, Photometrie u. Spektrometrie.
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg. (1955)
10. Lorentz, K.: Färberische und mikrodensometrische Untersuchungen über die Ultrastrukturdichte der Knochengrundsubstanz.
Virchows Arch. 331 (1958) 72
11. Lorentz, K.: Histochemische Aspekte bei der Azanfärbung des Knochens.
Histochemie 2 (1960) 136
12. Looser, E.: Über Spätrachitis u. Osteomalacie. Klinische, röntgenologische u. pathologisch-anatomische Untersuchungen.
Dtsch. Z. Chir. 152 (1920) 210
13. Möllendorf, W. v.: Zur kritischen Auswertung gefärbter Strukturen in fixierten Präparaten.
Derm. Wschr. 49/50. (1923) 1417
14. Möllendorf, W. v. und Möllendorf, M. v.: Untersuchungen zur Theorie fixierter Präparate.
Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 25 (1924) 1
15. Okura, T.: Modellversuche über die Beziehung zwischen der Strukturdichte u. der Färbbarkeit.
Arch. hist. jap. 1 (1950) 1

16. Okura, T. und Koyama, Y.: Elektronenmikroskopie von Farbstoffen, die zur Messung der Strukturichte der Gewebsteile verwendet werden.
Arch. hist. jap. 1 (1950) 4
17. Romeis, B.: Mikroskopische Technik.
München: Leibnitz 1948
18. Schmitt-Rohde, J.M.: Über das Wesen der Knochen-
erweichung und die Möglichkeiten
ihrer frühzeitigen Erfassung.
Habilitationsschrift Freie Univer-
sität 1957
Erg. Inn. Med. u. Kinderheilkunde.
10 (1958) 384
19. Unna, P.G.: Antwort auf Nr. 8.
Derm. wscr. 49/50 (1923) 1424
20. Yasuda, H.: Beobachtung der mit hochfrequentem
Schall behandelten Kollagenfasern
im Elektronenmikroskop u. Bestim-
mung ihrer sublichtmikroskopischen
Strukturichte auf färberischem
Wege.
Arch. hist. jap. 8 (1955) 4

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.Do. Dr.med. F.J. Haberich für seine vielen Anregungen, zahlreichen Ratschläge und geduldigen Hilfen danken, ohne die eine Fertigstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre. Ich möchte aber auch in Dankbarkeit Herrn Priv.Do. Dr.med. J.M. Schmitt-Rohde gedenken, der mich zuerst mit der Thematik der Dissertation vertraut machte, aber leider durch seinen viel zu frühen Tod die Vollendung nicht mehr erleben konnte.

Lebenslauf

Ich, Michael Boeck, wurde am 30. März 1934 als Sohn des Arztes Dr.med. Günther Boeck und seiner Ehefrau Lisa in Berlin geboren. Die Einschulung zur Grundschule erfolgte 1940. Die Reifeprüfung absolvierte ich am 12.2.1953 am humanistischen Gymnasium der Menzelschule zu Berlin-Tiergarten. Im April des gleichen Jahres wurde ich für das Fach Human-Medizin an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Dort bestand ich die ärztliche Vorprüfung am 30.4.1956. Die fachliche Weiterbildung erfolgte gleichfalls in den Kliniken und Instituten der Freien Universität Berlin bis zur Ableistung des Staatsexamens am 26.8.1959.

Die Medizinalassistentenzeit führte mich vom 1.10.1959 - 30.9.1961 in die II. Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin (Prof.Dr.med.Bartelheimer), in die orthopädische Universitätsklinik der Freien Universität (Prof.Dr.med.Witt), in die gynäkologische Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses (Prof. Dr. Dr. Gesenius) und in die chirurgische Abteilung des Elisabeth-Krankenhauses (Dr.med. Johannsen). Die Approbation erhielt ich am 30.9.1961 und begann danach meine Assistentenzeit am 1.10.1961 im pathologischen Institut des städt. Krankenhauses Neukölln (Prof.Dr.med. Köhn). Am 1.10.1962 ging ich zur weiteren klinischen Ausbildung an das Röntgeninstitut und die strahlentherapeutische Klinik im städt. Krankenhaus Moabit (Prof. Dr.med. Birkner), in dem ich noch tätig bin.

